

- For more records, click [Records](#) link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

✓ Select All

✗ Clear Selections

Print/Save Selected

Send Results

Display Selected

Format

Free

1. ☐ 15/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

010438892

WPI Acc No: 1995-340209/199544

XRAM Acc No: C95-150003

Agent for treating brain infarction - contains activated protein C

Patent Assignee: ZH KAGAKU & KESSEI RYOHO KENKYUSHO (KAGA)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 7233087	A	19950905	JP 94340208	A	19941228	199544 B
JP 3113787	B2	20001204	JP 94340208	A	19941228	200065

Priority Applications (No Type Date): JP 93350154 A 19931228

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 7233087	A		6	A61K-038/46	
JP 3113787	B2		7	A61K-038/46	Previous Publ. patent JP 7233087

Abstract (Basic): JP 7233087 A

Agent contains activated protein C (APC).

ADVANTAGE - The APC originated from blood is highly safe.

In an example, Protein C was purified from plasma by anion exchange treatment and immuno-affinity chromatography and activated with thrombin to prepare APC. 2000 U/kg of APC was dosed intravenously to a rabbit. 0.4 ml of 2.5 mg/ml arachidonic acid was dosed to A. carotis interna at a constant rate for 24 hrs. The movement including torticollis and overturn, the mortality and the infarction rate were examined. The mortality was 16.7%, compared to 33.3% for a control. The infarction rate was 60%, compared to 100% for a control. The Evans' Blue leakage was 95.85 micro-g, compared to 178.25 micro-g for a control. The cerebral oedema rate was 2.98% compared to 6.60% for a control. Nonperfusion region was 18.7% for 8,000 U/kg dose of APC, compared to 40.0% for the solvent. The dose of APC decreased the nervous symptom e.g. one-side-palsy characteristic to brain infarction.

Dwg. 0/0

Title Terms: AGENT; TREAT; BRAIN; INFARCTION; CONTAIN; ACTIVATE; PROTEIN

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-038/46

International Patent Class (Additional): A61K-038/48; A61P-009/10;

C12N-009/64

File Segment: CPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

✓ Select All

✗ Clear Selections

Print/Save Selected

Send Results

Display Selected

Format

Free

© 2005 Dialog, a Thomson business

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-233087

(43) 公開日 平成7年(1995)9月5日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/46	ACB			
38/48	ABN			
C 1 2 N 9/64		Z		
			A 6 1 K 37/ 54	ACB
			37/ 547	ABN
			審査請求 未請求 請求項の数1	FD (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平6-340208

(22) 出願日 平成6年(1994)12月28日

(31) 優先権主張番号 特願平5-350154

(32) 優先日 平5(1993)12月28日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

特許法第30条第1項適用申請有り 1993年6月30日 発行の「国際血栓止血学会誌 第69巻 6号」に発表

(71) 出願人 000173555
財団法人化学及血清療法研究所
熊本県熊本市清水町大窪668番地

(72) 発明者 小田 嘉明
熊本県熊本市秋津2丁目10-2

(72) 発明者 国生 智子
熊本県熊本市渡鹿5丁目19-5

(72) 発明者 北嶋 修司
熊本県熊本市清水町山室295-2

(72) 発明者 津元 兼二
熊本県菊池郡菊陽町津久礼3943-5

(72) 発明者 清上 寛
熊本県菊池郡菊陽町幾久富1647-151

(54) 【発明の名称】 脳梗塞予防治療剤

(57) 【要約】

【目的】 新規な脳梗塞予防、治療用製剤を提供する。

【構成】 活性化プロテインC (A P C) を有効成分として含有する脳梗塞予防、治療用製剤。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 活性化プロテイン C を含有する脳梗塞予防、治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は活性化プロテイン C (以下、APC と称することがある) を有効成分として含有する脳梗塞予防、治療用製剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術並びに発明が解決しようとする課題】 脳出血、脳梗塞あるいはクモ膜下出血等の脳血管疾患は、CT スキャナーの普及、MRI の使用等による鑑別診断が進み死亡率は減少しているものの、これらの疾患が関与するわが国の年間推定死亡数は約 12 万人と世界的にみても高いレベルにある。また、致死性の脳卒中の減少と共に後遺症を伴う患者数が増加していることから、これからの治療は生命予後のみではなく、機能予後を考慮する必要があり、特に急性期の治療の重要性が叫ばれている。

【0003】 脳梗塞は、脳血栓と脳塞栓に大きく分けることができる。脳血栓の形成は、脳底動脈、Willis 輪あるいはその分枝の高度の動脈硬化を基盤とする。一般に動脈内面が内皮細胞より被覆されている限り血小板の付着はまれで、血小板とフィブリンを主体とする白色血栓の形成は通常観られない。しかし、高血圧あるいは血液の乱(渦)流による内皮細胞の障害、内皮下組織の露出、動脈壁トロンボプラスチン活性の亢進、フィブリン融解能の低下などが直接の誘引となり、血小板の付着・凝集が生じると、フィブリンや血球なども参加して血栓は成長する。動脈内腔を閉塞すれば脳血栓症となり、また壁在血栓の一部が崩壊し、小片となって末梢の小動脈を閉塞すれば一過性脳虚血性発作(transient ischemic attack, TIA)の一因となる。

【0004】 一方、脳塞栓は、脳以外の血管内に形成された血栓が血流により運ばれて、脳血管を栓塞するもので、血栓源としてはリウマチ性心疾患、不整脈、心筋症、僧帽弁逸脱症などの心疾患由来が多い。最近では、生活習慣の欧米化に伴い血栓源として虚血性心疾患や頭蓋外動脈病変の増加が観られている。

【0005】 現在、脳梗塞の治療方法としては、おおまかに、血栓形成に第一義的に関与する血小板凝集を阻止する方法(アスピリン、ジピリダモール、チクロピジンなど、抗血小板薬)、その凝集を進展させ、血栓をより強固なものとするフィブリン形成を抑制する方法(ヘパリン、ワーファリン、など抗凝血薬)、さらに一旦形成された血栓、特にフィブリンを溶解し血行再開を図ろうとする血栓溶解療法(ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベータなど血栓溶解薬)が実施されている。しかし、いずれも出血傾向をきたすため、その投与は慎重になされなければならない。

加えて、これらの療法は梗塞によって生じた虚血性の炎症病変に対しては何等効果はなく、実際の臨床効果も充分なものではない。

【0006】 そこで、本発明者らは脳梗塞予防、治療剤を開発すべく鋭意研究した結果、APC が脳梗塞の予防、治療剤として、人間その他の動物に適応できることをみだし、この発見に基づいて本発明を完成するに至った。本願発明においては、従来、脳梗塞の治療に対して試みられることのなかった APC を用い、実際に疾患モデル動物での生体内投与によって APC の脳梗塞予防、治療薬としての効果を確認した点に大きな特徴を有する。

【0007】 APC は、2 本鎖からなる分子量 62,000 の抗凝固作用を有するセリンプロテアーゼである。この APC は通常その前駆体であるプロテイン C (以下、PC と称することがある) として血中に存在するが、いったん凝固系が作動すると生じたトロンビンにより限定分解を受け、酵素活性を発現する。APC は、細胞膜リン脂質に結合した血液凝固系の活性化された第 VII 因子(FVIIa)及び第 V 因子(FVa)を選択的に限定分解、失活させ、強力な抗凝固作用を発揮する(Biochemistry, 16, p.5824-5831(1977)、J.Biol.Chem., 258, p.1914-1920(1982))。また、血管内皮細胞、あるいは血小板由来の組織プラスミノゲン・アクチベータ・インヒビター(PAI)が、APC で中和されることにより、相対的にプラスミノゲン・アクチベータ(t-PA)が増加することが指摘され、APC は線溶系にも深く関与していることが示唆されている(Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82, p.1121-1125(1985))。APC には上述のように抗凝固作用、PAI 中和作用の保有が知られているが、下記実施例で示すように、脳血管障害に対する作用、血管透過性抑制作用、浮腫抑制作用の保有も明らかになった。

【0008】 本発明に使用される APC を製造する方法は特に限定されていないが、例えばヒト血液より分離した、あるいは遺伝子組換え技術により得た PC を活性化する方法、ヒト血液より APC を分離する方法、あるいは遺伝子組換え技術により直接 APC を調製する方法などによって製造することができる。PC から APC への活性化の方法には特に制約はなく、例えばヒトやウシなどの血液より分離したトロンビンにより活性化する方法、あるいは蛇毒により活性化する方法などにより実施できる。

【0009】 血液由来の APC の製法としては、以下の方法が挙げられる。例えば、ヒト血漿から抗 PC 抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製された PC を、ヒトトロンビンで活性化した後、陽イオンクロマトグラフィーを用いて精製する方法(Blood, 63, p.115-121(1984))、あるいは Kiesel による、ヒト血漿からクエン酸 B a 吸着・溶出、硫酸アンモニウム画分化、DEAE-セファデックスカラムクロマトグラフィー

一、デキストラン硫酸アガロースクロマトグラフィー及びポリアクリルアミドゲル電気泳動の工程により精製して得られたPCを活性化してAPCとする方法(J.Clin. Invest., 64, p.761-769(1979))、あるいは市販のPCを含有する血液凝固製剤をTayer等の方法(J.Clin. Invest., 79, p.918-925(1987))で活性化してAPCとする方法などがある。また、遺伝子組換え技術を用いてAPCを調製する方法としては、例えば特開昭61-205487号、特開昭62-111690号、特開平2-2338号あるいは特開昭64-85084号などに記載された方法などがある。

【0010】上述の方法で調製されたAPCの活性を最大限に維持するために、本発明のAPCは新鮮であるか、4℃で保存する場合には保存後約5日以内のものが好ましい。あるいは、本発明のAPCは好適な安定化剤と共に凍結乾燥して保存することができし、さらには、APC溶液を凍結し保存することも可能である。本発明では、かかる有効成分としてのAPCと公知の適当な賦形剤を組み合わせ、公知の方法で本発明の脳梗塞治療用製剤とすることができる。APCの有効投与量は、例えば投与対象者の年齢、症状及び重症度などにより変動するものであり、最終的には医師もしくは獣医師の意図により変動するものである。APCの有効投与量は、例えば一般に成人一日当り5,000~50,000Uであり、望ましくは10,000~30,000Uを1~2回に分けて投与するのがよい。投与方法は単回大量(ボラス)あるいは点滴の静脈内投与が最適である。なお、ここで言う1Uとは、正常ヒト血漿の活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を2倍に延長する量を意味するものである。

【0011】脳梗塞治療薬としてAPCを使用する場合、APCを単独で投与することもできし、t-PAなどの線溶療法薬との併用投与も効果を増大させるための有効な手段として期待できる。本件発明のAPC含有製剤は、患者が脳梗塞発作を起こした直後から投与されることが最も効果的である。APCの特徴の一つとして出血傾向をきたさないことから、脳出血をきたし易い脳塞栓患者にも安心して投与できる。

【0012】今回の実施例に使用した血液由来のAPCは、マウスでの単回静脈内投与毒性試験、反復静脈内投与毒性試験、一般薬理試験(ビーグル犬を用いた呼吸循環器系に及ぼす影響)、ウイルス不活化試験などにより

その安全性が確認されている。さらに汎発性血管内血液凝固症候群(DIC)を適応症とした臨床試験も実施されておりヒトでの安全性も確認されている。

【0013】以下、実施例に沿って本発明をさらに詳細に説明するが、これら実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

【0014】

【実施例】APC投与による脳梗塞化軽減、脳浮腫軽減、脳梗塞巣縮小、脳梗塞に伴う神経症状の軽減効果が以下の実施例により確認できた。

【0015】実施例 1

本実験は、一過性脳虚血発作から脳梗塞(特に血栓性脳梗塞)への移行を想定したモデルとして、また脳虚血時における遊離脂肪酸(主にアラキドン酸)による血管内皮細胞障害を反映するモデルとして確立されている方法(Neurology, 26, p.297-304(1976)、Microbiol Immunol., 22, p.89-101(1978)、Folia pharmacol. Japon., 92, p.193-200(1988))を参考にして実施されたものであり、脳血栓モデルとして最適な評価系と考えられる。

【0016】ウサギ(日本白色種、雄、体重:2.0~2.5kg)を背位に固定し、頸部を切開、左外頸動脈より外頸・内頸動脈分岐部までポリエチレンカニューレを逆行性に挿入した。APC(血液由来のAPC:陰イオン交換処理及びイムノアフィニティークロマトグラフィーの方法を用いて血漿から精製したPCをトロンビンで活性化して得た)2000U/kgをウサギ耳静脈内に投与し5分後、このカニューレを介してアラキドン酸(Sigma社製)2.5mg/ml、0.4mlを内頸動脈に一定の速度で注入し、24時間後の行動(斜頸、転倒)、死亡率を観察した。また脱血、致死後脳を摘出し、視交叉を基点として冠状切片を作製して、TTC染色、ホルマリン固定後、梗塞巣の解析を行なった。またアラキドン酸注入5分後に2%エバンスブルー溶液を1ml/kg注入し、アラキドン酸注入1時間後に脱血致死させ、脳を摘出した。脳の左・右半球を分離して湿重量測定、エバンスブルー定量により評価した。TTC染色および組織学的観察では注入側(左)半球の視床下部を中心に視床、大脳皮質などに梗塞巣、壊死巣が観られた。なかには脳軟化に至る例も観られた。

【0017】

【表1】

(行動、死亡率、梗塞率、梗塞面積)

群名	例数	行 動	死亡率(%)	梗塞率(%)
対照 (saline)	6	+++	2/6(33.3)	4/4(100)
溶媒 (Vehicle)	6	+++	2/6(33.3)	4/4(100)
APC 2000U/kg	6	±または++	1/6(16.7)	3/5(60)

行動:斜頸、転倒の強さを4段階で表した。

【表2】

【0018】

(エバンスブルー漏出量)

群名	例数	左半球(梗塞側) (μ g)	右半球 (μ g)	全 体 (μ g)
対照 (saline)	6	137.90 \pm 72.81	40.35 \pm 21.26	178.25 \pm 89.91
溶媒 (Vehicle)	6	144.15 \pm 61.31	49.90 \pm 24.23	194.05 \pm 76.19
APC 2000U/kg	6	61.20 \pm 28.23 ^{a, b}	34.65 \pm 13.75	95.85 \pm 38.98 ^c

a: $p < 0.05$ 対 対照群(Student's t-test)

【0019】

b: $p < 0.02$ 対 APC 群(Student's t-test)

【表3】

c: $p < 0.05$ 対 APC 群(Welch test)

30

(脳浮腫率)

群名	例数	浮腫率(%)
対照 (saline)	6	6.60 \pm 5.18
溶媒 (Vehicle)	6	7.77 \pm 3.75
APC 2000U/kg	6	2.98 \pm 1.92 ^a

a: $p < 0.05$ 対 対照群(Welch t-test)

【0021】実施例 2

浮腫率(%) = (左(梗塞側)W - 右W) \times 1 / 右W \times 100

本実験は、主として、虚血後の脳微小循環障害を反映するモデルとして確立されている方法(STROKE, 10, p.267-272(1979)、薬理と治療, 14, p.25-32(1986))を参考にし、実施されたものであり、虚血後の微小循環障害による梗塞巣の拡大を反映したモデルとして最適な評価系と考えられる。

W:湿重量

【0020】表1、2、3いずれにおいても、APCの前投与により脳梗塞化軽減、脳血管透過性亢進の抑制効果、それに伴う脳浮腫の軽減効果が確認できた。このことは、APCの脳梗塞における脳血管障害防止、浮腫、梗塞発生の抑制に関する有用性を示すものである。

50

【0022】ラット(ウイスター系、雄、体重:250~

350g)をペントバルビタールで麻酔下、背位に固定し、頸部を切開、両側椎骨動脈を第一頸椎の alar foraminaで電気凝固切断した。24時間後、両側頸動脈にクリップを掛けて血流を遮断し4血管を閉塞した。30分後に両側のクリップを外し、血流を再開させた。血流再開5分後に開胸して、左心室から墨汁10mlを4分間で灌流した。その後、脳を採取しホルマリン固定後、冠状断に切断して、墨汁で灌流されていない領域(非灌流

領域)の割合を画像解析により算出した。

【0023】APC(血液由来のAPC:陰イオン交換処理及びイムノアフィニティークロマトグラフィーの方法を用いて血漿から精製したPCをトロンビンで活性化して得た)2,500~8,000U/kgをラット大腿静脈内に両側頸動脈閉塞5分前に投与した。

【0024】

【表4】

群 名	例 数	非灌流領域(%)
溶 媒	7	40.0 ± 20.9
APC 2,500U/kg	6	27.5 ± 5.9
APC 4,000U/kg	6	22.4 ± 10.0
APC 8,000U/kg	7	18.7 ± 11.6

【0025】表4において、APCを前投与することにより、非灌流領域の減少が確認できた。このことは、APCの脳梗塞における脳梗塞化軽減、脳梗塞巣縮小における有用性を示すものであると考えられる。

【0026】実施例 3

本実験は、脳梗塞の典型的なモデルとして確立されている方法(脳卒中、8,p.1-8(1986)、基礎と臨床、25,p.183-191(1991))を参考にして実施されたものであり、脳梗塞にともなう神経症状(片麻痺)のモデルとして最適な評価系と考えられる。

【0027】ラット(ウイスターST系、雄、体重:250~350g)をペントバルビタールで麻酔下、背位に固定し、頸部を切開、右内頸動脈から糸付き栓子(直径

0.25mm、長さ7mm)を挿入し、中大脳動脈起始部を栓子の側面で閉塞した。2時間閉塞後、栓子を抜去して再灌流させた。再灌流開始2時間後、神経症状を表5に記載のスコアに基づいて観察した後、18時間後に再度神経症状を観察してその改善度を評価した。APC(血液由来のAPC:陰イオン交換処理及びイムノアフィニティークロマトグラフィーの方法を用いて血漿から精製したPCをトロンビンで活性化して得た)8,000U/kgをラット尾静脈内に3回(再灌流直前、再灌流開始2、6時間後)投与した。

【0028】

【表5】

項目	点数	症 状
横転	0:	左右脇腹を押しても倒れず、逃げない 1: 左脇腹を押すと、抵抗し、動かないか左へ移動 2: 左脇腹を押すと、押した指を軸として左回転する 3: 右脇腹を押すと倒れる 4: 死亡
頭	0:	首をつまみ上げた時、頭を左右に向けるが、両目の位置は水平 1: 頭を左に向けるが、両目の位置は水平 2: 頭を左に向け、右目を上、左目を僅かに下 3: 頭を左に向け、右目を上、左目を著明に下 4: 死亡
前肢	0:	首をつまみ上げた時、両前肢の位置が水平 1: 左前肢を僅かに下 2: 左前肢を下にするが、腹部にはつけない 3: 左前肢を著しく下にし、ほとんど腹部につける 4: 死亡
尾吊り下げ	0:	上体を左右どちらにも動かし、腰を激しく動かす 1: 左前肢を右に向け上体をややひねり、腰は激しく動かす 2: 左前肢を右に向け上体をひねるが、腰の激しい動きはない 3: 左前肢を右に向け極度に上体をひねり、右後肢を左に向ける 4: 死亡
歩行	0:	どの方向にも正常に歩行 1: 左右どちらかの歩行が多い 2: 左旋回のみ 3: 自発歩行の著明な抑制あるいは踉蹌と激しい周回行動 4: 死亡
後肢	0:	左後肢の甲をペンで持ち上げたときすぐ逃げる 1: 右後肢に比較して逃げるのが若干遅れる 2: ときどき逃げる 3: 逃げない 4: 死亡

【0029】

【表6】

群名	例数	神経症状スコア(total)	
		2時間後	18時間後
control	8	12.75±2.22	12.63±7.24
APC 80000/kg x3 1 2		11.00±2.31	8.33±4.09

【0030】表6において、APCを投与することにより、脳梗塞特有の神経症状(片麻痺など)を緩和することが確認できた。このことは、APCの脳梗塞における機

能予後改善における有用性を示すものであると考えられる。